

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif. Penelitian deskriptif bertujuan untuk membuat deskripsi, gambaran, atau lukisan secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antarfenomena yang diselidiki (Nazir, 2005).

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri endofit *A. conyzoides*. Sampel dari penelitian ini adalah empat isolat biakan bakteri endofit akar *A. conyzoides* yaitu I13, I14, B14, dan B15 yang dikultur di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Pemilihan sampel berdasarkan hasil pengujian ekstrak potensial antibakteri yang dilakukan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ihsan (2013).

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan Maret sampai dengan bulan September 2015 dan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan selama penelitian ini terdapat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Bioteknologi, Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Alat dan bahan yang digunakan dapat dilihat di lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Sebelum dilakukan penelitian dilakukan pengecekan alat dan bahan yang akan digunakan selama penelitian. Semua alat seperti cawan petri, tabung erlenmeyer, tip, tabung mikro dan tabung PCR yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu untuk mengurangi kontaminasi oleh organisme lain. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Khusus untuk proses PCR semua tip dan tabung PCR yang akan digunakan harus dalam keadaan baru dan steril. Pada tahap persiapan dilakukan juga pembuatan medium Luria Bertani Agar (LA) untuk subkultur empat isolat bakteri dari *cryo* dan medium Luria Bertani Broth (LB) untuk subkultur bakteri yang akan digunakan untuk isolasi DNA. Medium Luria Bertani Broth dibuat dengan melarutkan 10g *tryptone*, 5g *yeast extract*, 10g NaCl dalam 1 liter akuades (Sezonov *et al.*, 2007). Medium yang telah dibuat juga disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

2. Tahap Penelitian

a. Subkultur Bakteri

Empat isolat bakteri endofit dari penelitian sebelumnya yaitu I13, I14, B14, dan B15 disubkultur pada medium LA untuk peremajaan. Subkultur bakteri dilakukan dalam *laminar air flow* yang sebelumnya telah disinari sinar UV selama 15 menit. Isolat bakteri yang akan disubkultur berasal dari bakteri yang sebelumnya telah diawetkan dalam *cryo buffer*. Dilakukan dua kali subkultur untuk mendapatkan koloni biakan murni dari masing-masing bakteri endofit dari akar *A. conyzoides* dari hasil subkultur *cryo*. Setiap isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian dipindahkan ke suhu 4°C.

b. Isolasi DNA Kromosom

Isolasi DNA dilakukan dengan metode Wilson (1997). Sebanyak 1,5 ml kultur dipindahkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi selama 2 menit pada 10.000 rpm untuk mendapatkan pelet sel bakteri. Pemisahan sel pelet bakteri dari supernatan medium terus dilakukan

hingga jumlah sel mencapai $\pm 100 \mu\text{l}$. Medium lalu dibuang sampai habis, dan pelet diresuspensi dengan menggunakan TE. Pelet ditambahkan deterjen 10% SDS sebanyak $30 \mu\text{l}$ dan proteinase K sebanyak $3 \mu\text{l}$ kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Setelah inkubasi, ditambahkan $100 \mu\text{l}$ 5 M NaCl dan $80 \mu\text{l}$ larutan CTAB. Sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Suhu 65°C merupakan suhu optimum bagi kerja CTAB dalam mengikat protein dan polisakarida. Sampel kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi terbentuk dua lapisan, lapisan atas (supernatan) dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan RNase 1010mg/ml sebanyak $1/100 \times$ volume cairan. Setelah itu tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Larutan kloroform isoamil alkohol (24 : 1) ditambahkan ke dalam sampel yang telah diinkubasi sebanyak $\frac{1}{2} \times$ volume total, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit. Fasa atas yang jernih dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Tabung yang mengandung supernatan lalu ditambahkan etanol absolut dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan DNA. Supernatan dibuang dan pelet DNA lalu dicuci dengan menggunakan etanol 70% sebanyak $1 \times$ volume total, disentrifugasi selama 15.000 rpm selama 5 menit. Lalu pelet dikeringkan pada oven, dan diresuspensi dengan menggunakan pelarut TE sebanyak $50 \mu\text{l}$. Selanjutnya kualitas dan kuantitas DNA diukur dengan metode spektrofotometri dan elektroforesis.

c. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer, Genesis Thermoscientific. Penentuan konsentrasi DNA hasil isolasi dilakukan dengan pengukuran absorbansi DNA pada gelombang 260 nm. Kemurnian DNA dilakukan dengan penghitungan rasio absorbansi DNA pada gelombang 260 dan 280 nm. Setelah diketahui konsentrasi dan kemurnian setiap sampel DNA, dilakukan pengenceran DNA untuk mendapatkan konsentrasi yang baik untuk proses PCR. Konsentrasi ini disamakan dengan tujuan agar kualitas produk amplifikasi yang dihasilkan bersifat homogen. Menurut Sambrook

& Russel (2001) konsentrasi DNA yang baik untuk digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi adalah sekitar 1 pg-1 µg.

d. Amplifikasi PCR Gen 16S rRNA dan *Pks*

Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan pasangan primer 63f-1387r (Marchesi *et al.*, 1998). Amplifikasi gen *pks* menggunakan pasangan primer DKF-DKR (Moffit & Neilan, 2001). Komposisi mix PCR yang digunakan terdiri dari 25µL *Dream Taq Green Master Mix* 1X, 2,5µL *forward primer* 0,5µM, 2,5µL *reverse primer* 0,5µM, 1µL *template DNA* (100ng), dan 19µL *free nuclease water*. Semua bahan yang diperlukan dicairkan (*thawing*), *divortex* dan *dispin* terlebih dahulu sebelum digunakan. Kemudian semua bahan mix PCR dihomogenkan dalam tabung pcr, *divortex* dan *dispin* kembali selama 5 detik dengan menggunakan sentrifugasi agar semua bahan tercampur secara merata dan terkumpul di dasar tabung.

Amplifikasi PCR dilakukan dengan *Mastercycler Personal Machine* (Eppendorf, Jerman). Primer 63f (5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC -3') – 1387r (5'- GGG CGG WGT GTA CAA GGC -3') untuk gen 16S rRNA diamplifikasi pada kondisi pra denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, ekstension pada suhu 72°C selama 1 menit, dan ekstension akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR dilakukan selama 25 siklus. Kondisi ini berdasarkan Marchesi *et al.* (1998) yang dioptimasi oleh Yusuf (2012). Gen *pks* diamplifikasi oleh primer *degenerate* DKF (5'- GTG CCG GTN CCR TGN GYY TC -3') – DKR (5'- GCG ATG GAY CCN CAR CAR MG -3') pada kondisi pra denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 52°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR dilakukan selama 30 siklus. Kondisi ini berdasarkan Moffit & Neilan (2001) yang telah dioptimasi disesuaikan dengan kondisi bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini.

e. Elektroforesis DNA

Hasil amplifikasi DNA kemudian dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis DNA. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis gel mini dari Bio-rad. Langkah kerja dilakukan berdasarkan Sambrook & Russell (2001). Proses elektroforesis dilakukan pada 1% gel agarosa. Gel agarosa dibuat sebanyak 40 ml setiap kali pencetakan, sehingga diperlukan 0,4g agarosa yang dilarutkan dalam 40mL ddH₂O untuk mendapatkan agarosa dengan konsentrasi 1%. Agarosa yang telah dilarutkan kemudian dididihkan dengan menggunakan *microwave* hingga agar larut dan berwarna bening. Selanjutnya, gel agarosa didiamkan hingga hangat-hangat kuku lalu dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) dan dibiarkan hingga mengeras pada suhu ruang, waktu yang diperlukan hingga gel agarosa mengeras dengan sempurna kurang lebih 1 jam. Sisir dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan.

Hasil cetakan gel yang sisirnya telah dilepas, kemudian diletakkan pada kolom elektroforesis dan direndam dengan *buffer* TAE 1X. Amplikon sebanyak 1 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Elektroforesis sampel dilakukan pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Gel yang telah dielektroforesis kemudian diwarnai dengan *Ethidium bromide* (EtBr) 0,5 µg/ml selama 5 menit, kemudian kelebihan EtBr dibilas dengan menggunakan akuades steril (Sambrook & Russel, 2001). Gel hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah sinar UV (*UV transluminator*) dan hasil fragmen DNA yang muncul didokumentasikan

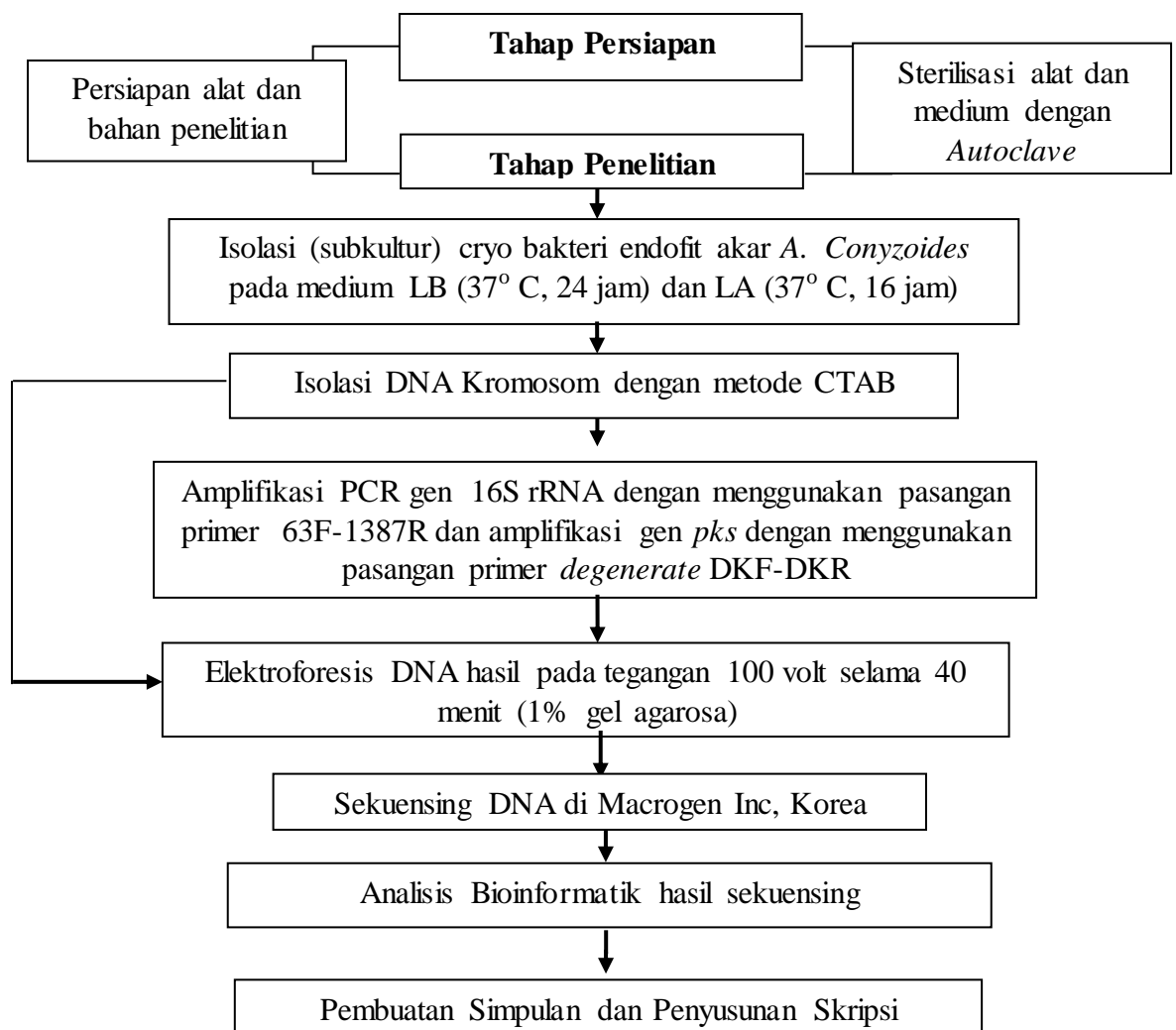
f. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* BigDye Applied Biosystem yang dilakukan di Macrogen Inc., Korea. Sebelum sampel dikirim untuk dianalisis dilakukan penghitungan konsentrasi amplikon hasil PCR dengan menggunakan spektrofotometer.

g. Analisis Data Bioinformatika

Analisis data bioinformatika dilakukan pada kedua sekuens gen *pks* dan gen 16S rRNA. Hasil sekuensing setiap sekuens gen *pks* dan gen 16S rRNA disejajarkan dan dibandingkan dengan data sekuens gen *pks* yang terdapat pada *GenBank National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan Ez Taxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/>). Selanjutnya, dilakukan proses *alignment* dari setiap sekuens dan gen *pks* menggunakan program *multiple-sequence alignment* dari software *Clustal X*. Analisis filogenetik bakteri endofit tersebut melalui pohon filogenetik yang dihasilkan menggunakan software *MEGA5*.

F. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian